

1
x

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :

2 797 890

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national :

99 10937

⑤1 Int Cl⁷ : C 12 N 15/57, C 12 N 9/64, 15/63, C 07 K 16/40,
C 12 Q 1/68, G 01 N 33/53, A 61 K 48/00, A 61 P 35/00, 29/00,
9/00

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 31.08.99.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 02.03.01 Bulletin 01/09.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : PIERRE FABRE MEDICAMENT —
FR.

⑦2 Inventeur(s) : BENOIT DE COIGNAC AMELIE,
ELSON GREG et GAUCHAT JEAN FRANCOIS.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤4 NOUVELLE METALLOPROTEASE MATRICIELLE MMP-24 HOMOLOGUE AUX STROMELYSINES.

⑤7 La présente invention concerne une nouvelle métallo-
protéinase matricielle transmembranaire MMP-24 qui est
exprimée dans les cellules tumorales. L'invention porte sur
un procédé de criblage de composés susceptibles d'affecter
l'activité de MMP-24, et sur l'utilisation desdits composés
pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement
du cancer, en particulier pour prévenir et/ ou empêcher la
formation de métastases, la vascularisation des tumeurs et
pour le traitement des maladies inflammatoires.

FR 2 797 890 - A1



5 La présente invention concerne une nouvelle métalloprotéinase matricielle transmembranaire MMP-24 qui est exprimée dans les cellules tumorales. L'invention porte sur un procédé de criblage de composés susceptibles d'affecter l'activité de MMP-24, et sur l'utilisation desdits composés pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement du cancer, en particulier pour prévenir et/ou empêcher la
10 formation de métastases, la vascularisation des tumeurs et pour le traitement des maladies inflammatoires.

Les métalloprotéases matricielles (MMP) appartiennent à une famille de protéases capables de cliver de nombreux composants de la matrice extracellulaire. Elles jouent
15 un rôle primordial dans le remodelage des tissus pendant la morphogenèse, la cicatrisation, l'angiogenèse et l'apoptose (1) et ont été impliquées dans de nombreuses pathologies impliquant des processus de dégradation comme l'arthrite rhumatoïde, l'invasion tumorale et la formation de métastase (2,3). Bien qu'elles révèlent différentes spécificités de substrats, les MMPs ont pu être regroupées de par leur séquence et
20 structure primaire. Elles peuvent être divisées en 4 sous-familles: les collagénases, les gélatinases, les stromélysines et les MMPs de types membranaires (MT-MMPs). Toutefois certaines MMPs ne peuvent être classées dans une de ces sous-familles, c'est le cas par exemple de la metalloélastase des macrophages (MMP-12) (4), de la matrilysine (MMP-7) (5), de MMP-19 (6) et de l'énamylsine (7). Les MMPs sont
25 traduites sous une forme "zymogène" inactive qui nécessite le clivage d'un prodomaine pour s'activer. Ce prodomaine, localisé immédiatement après le peptide signal, contient une cystéine unique qui interagit avec l'ion Zn^{+} du domaine catalytique afin de maintenir la protéase sous forme inactive. Dans le cas des MMPs activées intracellulairement, le prodomaine est séparé du domaine catalytique par un site de
30 clivage "furine". Le domaine catalytique contient la séquence hautement conservée

liant le zinc HEXGHXXGXXHS/T (SEQ ID N°3) ainsi que des sites liant le calcium. Le domaine catalytique est séparé du domaine c-terminal du type hémopexine par un "linker" riche en proline habituellement appelé "région charnière". Le domaine du type hémopexine contient 4 domaines répétitifs homologues à l'hémopexine et à la vitronectine. Bien que ce dernier domaine ne soit pas essentiel pour l'activité de la protéase, il semble toutefois fondamental pour la spécificité de substrat (voir revue (8)). Certaines MMPs comprennent, en plus des domaines décrits ci-dessus, d'autres régions caractéristiques; La sous-famille des gélatinases (MMP-2 et MMP-9) contient trois motifs répétés "fibronectine de type II", insérés dans le domaine catalytique, permettant d'augmenter l'affinité pour les substrats gélatines. Dans la sous-famille des MT-MMPs, comprenant actuellement 5 membres, le domaine hémopexine se poursuit par une région hydrophobe transmembranaire et une région cytoplasmique (9) (10). Par contre, dans le cas de MMP-7 (la matrilysine), la plus courte MMP identifiée jusqu'à présent, le domaine hémopexine est absent (5). Il en est de même pour MMP-23 qui a récemment été clonée (Velasco, Pendas, et al. 1999 ID: 1995).

Dans le cadre de la présente invention, on a cloné, à partir de tissus placentaire, un ADNc codant pour une nouvelle protéinase. Cet ADNc code pour une protéine de 526 acides aminés présentant tous les motifs caractéristiques de la famille des métalloprotéases (MMP). Les 19 acides aminés du peptide signal sont suivis par, 1) un pro-domaine contenant une cystéine unique capable d'inactiver la proenzyme en se liant au zinc du domaine catalytique, 2) un domaine catalytique avec une séquence liant le zinc HESGHALGLSHS (SEQ ID N°4), 3) une région charnière riche en proline, 4) un domaine hémopexine et une région transmembranaire suivie par une région cytoplasmique extrêmement courte. Cette protéinase, ci-après désignée MMP-24, présente une forte homologie avec la stromélysine 2 humaine (51.6 % d'identité). Le domaine catalytique de MMP-24 présente 60% d'identité avec les domaines catalytique des collagénases 1 et 2 (MMP-8, MMP-1) et des stromélysines 1 et 2 (MMP-3, MMP-10). Le gène de MMP-24 a été localisé sur le chromosome 11 en q24, proche de la région où les stromélysine 1 et 2 ont été localisées (11q23).

Des analyses par Northern blot de la distribution en ARN messager de MMP-24 révèle un transcrit majeur de 1.6 kb, fortement exprimé au niveau du foie fœtal et adulte ainsi que dans l'intestin grêle et la moelle osseuse. L'expression de ce transcrit est aussi
5 détectable dans le thymus, le cœur et le placenta. Cette analyse a ensuite été étendue à de nombreuses lignées cellulaires humaines. L'ARN messager de MMP-24 est détectable dans la lignée lymphoblastoïde RPMI 8226, une lignée de rein HEK 293, une lignée de lymphome B humaine HFB1 et des clones de mélanomes humains TIC3 et IC8.

La protéine MMP-24 a été produite par transcription-traduction in vitro. La taille de la
10 protéine marquée (58kDa) était conforme au poids moléculaire prédit. L'étude de l'expression de formes "taggées" de la protéine transfectée de manière transitoire dans les cellules COS 1 a montré, par Western blot tout comme par immunofluorescence, que la partie hydrophobe carboxy-terminale de MMP-24 ancre la protéine dans la membrane. Ainsi, MMP-24 est une protéine transmembranaire impliquée dans la
15 dégradation de la matrice extracellulaire. Le fait que cette protéinase soit exprimée dans les cellules tumorales implique qu'elle joue un rôle notamment dans les métastases des tumeurs et dans l'angiogénèse.

Description

20

Ainsi, la présente invention concerne une séquence nucléotidique comprenant une séquence ayant au moins 80% d'identité avec le gène codant pour la metalloprotéinase MMP-24. De préférence, cette séquence comporte la séquence suivante (SEQ ID N°1) :

25

1 GAAGAAAGAG AGGAATGAAG CGCCTTCTGC TTCTGTTTTT GTTCTTTATA

51 ACATTTTCTT CTGCATTTCCTTAGTCCGG ATGATGGAAA ATGAAGAAAA

30

101 TATGCAACTG GCTCAGGCAT ATCTCAACCA GTTCTACTCT CTTGAAATAG

151 AAGGGAATCA TCTTGTTCAA AGCAAGAATA GGAGTCTCAT AGATGACAAA

201 ATTCGGGAAA TGCAAGCATT TTTTGGATTG ACAGTGA CTG GAAAACTGGA
251 CTCAAACACC CTTGAGATCA TGAAGACACC CAGGTGTGGG GTGCCTGATG
5 301 TGGGCCAGTA TGGCTACACC CTCCCTGGGT GGAGAAAATA CAACCTCACC
351 TACAGAATAA TAAACTATAC TCCGGATATG GCACGAGCTG CTGTGGATGA
401 GGCTATCCAA GAAGGTTTAG AAGTGTGGAG CAAAGTCACT CCACTAAAAT
10 451 TCACCAAGAT TTCAAAGGGG ATTGCAGACA TCATGATTGC CTTTAGGACT
501 CGAGTCCATG GTCGGTGTCC TCGCTATTTT GATGGTCCCT TGGGAGTTCT
15 551 TGGCCATGCC TTTCCTCCCT GGTCGGGTCT GGGTGGTGAC ACTCATTTTG
601 ATGAGGATGA AAACCTGGACC AAGGATGGAG CAGGATTCAA CTTGTTTCTT
651 GTGGCTGCTC ATGAATTTGG TCATGCACTG GGGCTCTCTC ACTCCAATGA
20 701 TCAAACAGCC TTGATGTTCC CAAATTATGT CTCCCTGGAT CCCAGAAAAT
751 ACCCACTTTC TCAGGATGAT ATCAATGGAA TCAAGTCCAT CTATGGAGGT
25 801 CTGCCTAAGG TACCTGCTAA GCCAAAGGAA CCCACTATAC CCCATGCCTG
851 TGACCCTGAC TTGACTTTTG ACGCTATCAC AACTTTCCGC AGAGAAGTAA
901 TGTTCCTTAA AGGCAGGCAC CTATGGAGGA TCTATTATGA TATCACGGAT
30 951 GTTGAGTTTG AATTAATTGC TTCATTCTGG CCATCTCTGC CAGCTGATCT
1001 GCAAGCTGCA TACGAGAACC CCAGAGATAA GATTCTGGTT TTAAAGATG
35 1051 AAAACTTCTG GATGATCAGA GGATATGCTG TCTTGCCAGA TTATCCCAAA
1101 TCCATCCATA CATTAGGTTT TCCAGGACGT GTGAAGAAAA TAGATGCAGC
1151 CGTCTGTGAT AAGACCACAA GAAAAACCTA CTTCTTTGTG GGCATTTGGT
40 1201 GCTGGAGGTT TGATGAAATG ACCCAAACCA TGGACAAAGG GTTCCCGCAG
1251 AGAGTGGTAA AACACTTTCC TGGAATCAGT ATCCGTGTTG ATGCTGCTTT
45 1301 CCAGTACAAA GGATTCTTCT TTTTCAGCCG TGGATCAAAG CAATTTGAAT
1351 ACGACATTAA GACAAAGAAT ATTACCCGAA TCATGAGAAC TAATACTTGG
1401 TTTCAATGCA AAGAACCAAA GAACTCCTCA TTTGGTTTTG ATATCAACAA

1451 GGAAAAAGCA CATTGAGGAG GCATAAAGAT ATTGTATCAT AAGAGTTTAA
 1501 GCTTGTTTAT TTTTGGTATT GTTCATTGTC TGAAAAACAC TTCTATTAT
 5 1551 CAATAAATTC ATAGACCTAA AATAAAAAAA AAAA

L'oligonucléotide selon l'invention peut comprendre au moins 12 nucléotides
 10 consécutifs de la séquence mentionnée ci-dessus ou d'une séquence capable de
 s'hybrider avec une séquence dérivée de MMP-24, notamment avec l'ARNm de
 MMP-24.

En ce sens, l'oligonucléotide peut servir de sonde, d'amorce, d'oligonucléotide
 15 antisens ou de fragment fonctionnel codant pour une MMP-24 modifiée (MMP-24
 comportant des délétions, insertions et/ou des mutations). On entend par « fragment
 fonctionnel » une partie de la séquence de MMP-24 qui code pour une protéinase ou
 partie de protéinase qui demeure active. L'activité doit alors se comprendre comme
 étant les propriétés de dégradation de la matrice extracellulaire, l'inhibition de
 20 l'angiogénèse, les propriétés anti-inflammatoire ou encore la capacité de se lier à
 d'autres protéines impliquées dans ces phénomènes.

Un autre aspect de l'invention porte sur un polypeptide comprenant une séquence
 peptidique ayant au moins 52% d'identité avec la metalloprotéinase MMP-24. De
 25 préférence le polypeptide possède la séquence SEQ ID N° 2 suivante :

MKRLLLLFLFFITFSSAFPLVRMTENEENMQLAQAYLNQFYSLIEGNHLVQSK
 NRSLIDDKIREMQAFFGLTVTGKLDSSLEIMKTTPRCGVPDVGQYGYTLPGWR
 KYNLTYRIINYTPDMARAAVDEAIQEGLEVWSKVTPKFTKISKGIADIMIAFR
 TRVHGRCPRYFDGPLGVLGHAFFPGPLGGDTHFDEDENWTKDGAGFNFLV
 30 AAHESGHALGLSHSNDQTALMFPNYASLDPRKYPLSQDDINGIQSIYGGPLPKV
 PAKPKEPTIPHACDPDLKTFDAITTFRREVMFFKGRHLWRIYYDITDVEFELIAS
 FWPSLPADLQAAYENPRDKILVFKDENFWMIRGYAVLPDYPKSIHTLXFPGRV
 KKIDAAVCDKTRKTYFFVGIWCWRFDEMTQTMDKGFPQRVVKHFPGISIRV

DAAFQYKGFFFFSRGSKQFEYNIKTKNITRIMRTNTWFCQCEPKNSSFGFDINE
KAHSGGIKILYHKSLSLFIFGIVHLLKNTSIYQ

Le polypeptide peut comprendre une combinaison de fragments de MMP-24
5 correspondant à des unités fonctionnelles sélectionnés notamment parmi le peptide
signal (SEQ ID N°2 aa 1-19), le prodomaine (SEQ ID N°2 aa 20-98), le domaine
catalytique (SEQ ID N°2 aa 99-262), le domaine charnière (SEQ ID N°2 aa 263-283)
et le domaine du type hemopexine (SEQ ID N°2 aa 284-513). Les protéinases MMP
ont montré qu'elles possèdent des fragments à activité anti-angiogénique, Dong Z.,
10 Kumar R., Yang X. and Fidler I. J. (1997) Cell 88, 801-810 ; Patterson B. C. and Sang
Q. A. (1997) J. Biol. Chem. 272, 28823-28825 ; Lijnen H. R., Ugwu F., Bini A. and
Collen D. (1998) Biochemistry 37, 4699-4702 ; Cornelius L. A., Nehring L. C.,
Harding E., Bolanowski M., Welgus H. G., Kobayashi D. K., Pierce R. A. and Shapiro
S. D. (1998) J. Immunol. 161, 6845-6852, citées dans la description par référence. Il
15 est ainsi à la portée de l'homme du métier de tester différents fragments ou « unités
fonctionnelles » et de déterminer le fragment minimum qui possède une activité anti-
angiogénique et/ou anti-inflammatoire ou le fragment minimum capable de dégrader la
matrice extracellulaire.

20 Par exemple, un fragment d'intérêt peut comporter le domaine du type hemopexine
(SEQ ID N°2 aa 284-513) qui est capable d'interagir avec d'autres protéines ou
polypeptides possédant une activité anti-inflammatoire ou anti-angiogénique, Brooks
P. C., Silletti S., von Schalscha T. L., Friedlander M. and Cheresch D. A. (1998) Cell 92,
391-400, citée dans la description par référence.

25

Un aspect complémentaire de l'invention a trait à un vecteur comprenant une séquence
ou une séquence codant pour un polypeptide tel que défini ci-dessus.

Cette séquence peut être fusionnée à un promoteur efficace dans les cellules eucaryotes
et/ou procaryotes. Le vecteur peut comporter en outre un gène de sélection. Dans un

mode particulier de réalisation, le vecteur peut exprimer un oligonucléotide capable d'inhiber l'expression de MMP-24.

Un autre aspect de l'invention porte sur un anticorps capable de se lier spécifiquement à un polypeptide tel que défini ci-dessus. Les anticorps peuvent être polyclonaux ou monoclonaux. Les anticorps polyclonaux sont obtenus en stimulant leur production dans un animal hôte approprié en injectant les polypeptides de l'invention éventuellement en association avec des adjuvants. Les anticorps monoclonaux peuvent être préparés à partir d'hybridomes selon la technique « Kohler & Milstein » (Nature 1975, 256 : 52-55). Les techniques permettant la production d'anticorps sont bien connues par l'homme du métier, notamment à travers des ouvrages généraux tels que Roitt et al, Immunology second edition (1989) Churchill Livingstone, London.

On entend par « anticorps » dans le cadre de l'invention, un anticorps, ses dérivés et ses fragments, Dougall et al, In Tibtech 12 : 372-379 (Sept 1994). On peut citer notamment les fragments Fab, F(ab')₂ et les Fv.

Ainsi, il est possible de procéder à la détection et/ou à la quantification d'un polypeptide selon l'invention en mettant en œuvre un oligonucléotide ou un anticorps décrit ci-dessus. A cet effet, il est utile de pouvoir disposer d'un kit de diagnostic comprenant ledit oligonucléotide ou ledit anticorps éventuellement marqué soit avec un isotope radioactif soit avec un composé fluorescent ou autre.

Un aspect supplémentaire de l'invention concerne un procédé d'identification du substrat de MMP-24 caractérisé en ce l'on met en œuvre la technique dite « phage display assay ». Cette technique, qui consiste à utiliser une bibliothèque de phages portant une séquence peptidique aléatoire est abondamment décrite dans la littérature, notamment dans Smith M.M, Shi L. and Navre M. (1995) Rapid identification of highly active and selective substrates for stromelysin and matrilysin using bacteriophage peptide display libraries. J. Biol. Chem. 270 (12) 6440-6449 ; et dans

Matthews D. J. and Wells J.A. (1994) A survey of furin substrate specificity using phage display. Protein Sci. 3(8) 1197-1205, citées dans la description par référence.

Une fois la cible de MMP-24 identifiée, il est possible de tester parmi différents familles ou bibliothèques de composés ceux qui affectent positivement ou négativement l'activité de MMP-24. On peut noter que des composés peptidiques modifiés chimiquement reprenant la structure du substrat de MMP-24 représentent des inhibiteurs potentiels.

- 10 Ainsi, la présente invention porte sur un procédé de criblage de composés susceptibles d'inhiber ou d'activer la dégradation de la matrice extracellulaire par MMP-24 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) fixation d'un complexe [colorant-substrat de MMP-24] sur un support solide,
 - b) addition d'au moins un composé susceptible d'inhiber ou d'activer MMP-24,
 - 15 c) Incubation avec un polypeptide explicité précédemment,
 - d) Détection de la quantité du colorant libéré.

Le support solide est de préférence une plaque ELISA. Lorsqu'un composé inhibe la protéinase, le colorant demeure lié à la plaque ELISA et est détecté. Autrement, le colorant est éliminé lors du rinçage de la plaque.

20 Parmi les composés susceptibles d'agir sur MMP-24, on peut notamment tester ceux qui ont déjà montré une activité agonistique ou antagonistique des protéinases, en particulier des stromélysines.

On peut en particulier s'intéresser à tester les composés décrits dans les documents suivants :

EP0891329 COMPOSES PEPTIDYLES AYANT UNE ACTIVITE INHIBITRICE DES MMP ET DU TNF.

EP0874842 COMPOSES DE MERCAPTOALKYLPEPTIDYL POSSEDANT UN SUBSTITUANT IMIDAZOLE ET LEUR UTILISATION COMME INHIBITEURS DE

- METALLOPROTEINASES MATRICIELLES (MMP) ET/OU DU FACTEUR DE
NECROSE TUMORALE (TNF)
EP0821671 DERIVES D'ACIDE HYDROXAMIQUE ARYLSUFONYLE EN TANT
QU'INHIBITEURS DE MMP ET DE TNF
- 5 EP0818443 MERCAPTOCETONES ET MERCAPTOALCOOLS, LEUR PROCEDE DE
PREPARATION ET LEUR UTILISATION COMME INHIBITEURS DE
METALLOPROTEINASES MATRICIELLES
EP0757037 DERIVES D'ACIDE SULFONYLAMINO COMME INHIBITEURS DE
METALLOPROTEINASE
- 10 WO9850351 NOUVEAUX DERIVES DE CYSTEINE, LEURS PROCEDES DE
PRODUCTION ET PRODUITS PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT
WO9839326 COMPOSES AROMATIQUES D'ACIDE SULFONYLE ALPHA-HYDROXY
HYDROXAMIQUE
WO9839316 COMPOSES N-HYDROXY-4-SULFONYL-BUTANAMIDEWO9839315
- 15 COMPOSES AROMATIQUES D'ACIDE SULFONYL ALPHA-CYCLOAMINO
HYDROXAMIQUE
WO9839313 COMPOSES D'ACIDE HYDROXAMIQUE SULFONAMIDE THIOARYLE
WO9838163 N-HYDROXY-2-(ALKYL,ARYL OU HETEROARYL SULFANYL,
SULFINYL OU SULFONYL)-ALKYL, ARYL OU HETEROARYLAMIDES SUBSTITUES
- 20 EN POSITION 3, UTILISES COMME INHIBITEURS DES METALLOPROTEINASE
MATRICIELLE
WO9827069 COMPOSES DE PIPERAZINE INHIBITEURS DE METALLOPROTEASE
MATRICIELLE (MMP) OU DE TNF
WO9816514 ACIDES ORTHO-SULFONAMIDO-BICYCLIQUES-HETEROARYL
- 25 HYDROXAMIQUES EN TANT QU'INHIBITEURS DES METALLOPROTEINASES
MATRICIELLES ET DE TACE
WO9816506 ACIDES BETA-SULFONAMIDO HYDROXAMIQUES UTILISES COMME
INHIBITEURS DE METALLOPROTEASES MATRICIELLES ET DE TACE
WO9812309 PROCEDE D'ACTIVATION ET D'INHIBITION DE SURFACE
- 30 CELLULAIRE
WO9804287 UTILISATION D'INHIBITEURS DE PROTEINASE POUR LA
PREVENTION OU LA REDUCTION DE LA RESORPTION OSSEUSE

WO9803164 COMPOSES A BASE DE SULFONE DE THIOL SERVANT D'INHIBITEURS
DES METALLOPROTEASES

WO9743247 INHIBITION DE METALLOPROTEASES MATRICIELLES PAR DES
COMPOSES DE PHENETYLE SUBSTITUES

5 **WO9747599** DERIVES DE SUCCINAMIDES UTILES EN TANT QU'INHIBITEURS DU
TNF ET/OU DES MMP

WO9743245 INHIBITION DE METALLOPROTEASES MATRICIELLES PAR DES
COMPOSES CONTENANT DE L'ACETYLENE

10 **WO9743240** INHIBITION DE METALLOPROTEASES MATRICIELLES PAR DES
ACIDES 2-(OMEGA-AROYLALKYL)-4-BIARYL-4-OXOBUTYRIQUES

WO9743239 INHIBITION DES METALLOPROTEASES MATRICIELLES PAR LES
ACIDES BIARYLE OXOBUTYRIQUES SUBSTITUES

Ainsi, l'invention vise un composé susceptible d'être obtenu à partir du procédé de
15 criblage indiqué ci-dessus. Ce composé peut inhiber ou activer l'activité de MMP-24.
L'invention a également pour objet une composition comprenant ledit composé ou un
vecteur décrit précédemment et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
La composition selon l'invention peut comporter en outre des agents choisis parmi
ceux couramment employés dans le traitement du cancer :

- 20 - Les dérivés des glucocorticoïdes,
- les agents alkylants tels que les moutardes à l'azote, par exemple la
cyclophosphamide,
- les complexes de Platine, par exemple la cisplatine,
- les dérivés de l'éthylène-imine, de diméthane sulfonyl-alcanes,
- 25 - les dérivés de la pipérazine,
- les inhibiteurs des topoisomérases tels que les inhibiteurs de la topoisomérase 2, par
exemple les anthracyclines, l'épipodophyllotoxine tel que l'étoposide, les inhibiteurs
de la topoisomérase 1, par exemple les dérivés de la camptothécine,
- les antimétabolites tels que les antifolates, par exemple le méthotrexate, les
30 antipurines, par exemple la 6-mercaptopurine, les antipyrimidiques, par exemple la 5-
fluorouracile,

- les antimitotiques tels que les vinca-alcaloïdes, les taxoïdes tel que le taxotere,
- les cytolytiques divers tels que la bléomycine, la dacarbazine, l'hydroxycarbamide, l'asparaginase, la mitoguazone, la plicamycine.

Ces agents antinéoplastiques sont décrits dans Actualité Pharmaceutiques n°302 (Oct 5 1992) pages 38 à 39 et 41 à 43 citée dans la description par référence.

On peut également choisir les radiations gamma utilisées en radiothérapie, l'étoposide, la doxorubicine, la dexaméthasone, la céramide telle que la ceramide C8, la lonidamine. Certains desdits agents anticancéreux, sont plus particulièrement décrits 10 dans US 5,260,327 qui concerne l'utilisation de la lonidamine pour traiter les métastases, dans JO 5017353 qui porte l'utilisation de la lonidamine en association avec d'autres agents anticancéreux, et dans EP 291151, qui décrit l'utilisation des dérivés de la phlorizine. Ces documents sont cités dans la description par référence.

15 Il est également possible d'associer le composé selon l'invention avec un composé connu pour induire une hypoxie des tumeurs, notamment les inhibiteurs de l'angiogénèse. On peut notamment citer l'endostatine et l'angiostatine décrites par J. Folkman, les thrombospondine-1 et -2 (TSP-1, -2) Locopo et al (1998) ; les facteurs IFN gamma, TNFalpha, et IL-1alpha, Maier et al (1999), U-995, un inhibiteur dérivé 20 du cartilage de requin, Sheu et al (1998). Ces publications, la revue sur les inhibiteurs naturels, Paper et al (1998), et la revue générale sur les différents inhibiteurs connus, Harris et al (1998) sont citées par référence dans la description.

Un autre aspect de l'invention se rapporte à l'utilisation d'un composé ou d'un vecteur 25 décrit précédemment pour la fabrication d'un médicament, notamment d'un médicament destiné au traitement du cancer, en particulier pour prévenir et/ou empêcher la formation de métastases, pour inhiber l'angiogénèse, notamment pour prévenir et/ou détruire la vascularisation des tumeurs, et/ou pour le traitement des maladies inflammatoires, notamment pour le traitement de l'arthrite et des

rhumatismes. Les récents développements des thérapies axées sur les MMP sont revues dans WO 98/40475 page 2 ligne 7 à page 3 ligne 34.

Pour la suite de la description, on se référera aux légendes des figures présentées ci-après.

Légendes

Figure 1 : Prédiction de la séquence en acides aminés et structure des différents domaines de MMP-24.

A- La région du "cystéine switch" (P89 - D95) ainsi que la région liant le zinc du domaine catalytique (H216 - H226) sont encadrées. Les sites potentiels de glycosylation sont soulignés ainsi que les cystéines conservées du domaine hémapexine. Le peptide signal et le domaine transmembranaire putatif sont en caractères gras.

B- MMP-24 possède la même organisation structurale que d'autres MMPs, avec un domaine NH₂-terminal formant la proenzyme (domaine I) contenant le "cysteine switch", un domaine catalytique avec des histides organisées de manière à lier une molécule de zinc au niveau du site actif (domaine II), et un domaine COOH-terminal contenant des homologies avec l'hémapexine et la vitronectine (domaine III). Dans le domaine hémapexine-like, la partie hachurée représente le domaine transmembranaire putatif.

Figure 2 : Alignement avec le programme CLUSTAL de la séquence prédite en acides aminés de MMP-24 avec les MMP-3, -10, -13, -8, -1 humaine.

Les résidus encadrés sont conservés.

Figure 3 : Analyse de l'expression de l'ARNm de MMP-24 dans différents tissus humain (A) et lignées cellulaires (B).

Des aliquots de 2 µg d'ARN polyA+ isolés à partir des tissus humain et lignées indiqués furent traités par Western blot, avec une sonde spécifique marquée au [32P]; les positions du marqueur de poids moléculaire sont indiquées sur la gauche.

5 **Figure 4 : Expression de MMP-24 dans les cellules COS-1 transfectées de manière transitoire.**

A- Analyse en Western blot. Les cellules sont transfectées avec les constructions ADNc de MMP-24 suivies du tag C-myc ou un contrôle positif codant pour une protéine de 45 kDa. Des aliquots de lysats de cellules transfectées (puits 4-6) ou de surnageants concentrés (puits 1-3) furent traités sur un gel SDS-PAGE et western blot avec un anticorps anti tag C-myc couplé à la HRP. Puits 1 et 4: cellules COS transfectées avec le ADNc codant pour contrôle positif; protéine sécrétée de 45 kDa, puits 2 et 5 : MMP-24 DT et puits 3 et 6: MMP-24FL.

10 B- Détection de MMP-24 dans les cellules COS 1 transfectées. L'immunofluorescence avec l'anticorps anti C-myc tag a été réalisée sur des cellules COS 1 transfectées par les constructions indiquées et perméabilisées. L'intensité de fluorescence a été analysée sur un microscope confocal.

Exemple 1 : Identification et clonage de l'ADNc codant pour MMP-24.

20

Matériels et méthodes:

Criblage de la base de données EST.

La base de donnée EST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a été criblée en utilisant le motif protéique EDGIAQIRGEIFFFKDRFIWR (SEQ ID N°5) dans la requête. Trente et un EST comprenant une séquence codant pour ce motif ont été identifiés et comparés avec les séquences de MMP déposées dans la base de donnée Swissprot (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Un EST (Acc#AA424347) de 410 paires de bases codant pour une nouvelle MMP a été sujet à une analyse plus poussée comme décrit ci-dessous. L'ADNc correspondant a été appelé MMP-24.

30

Clonage de l'ADNc de MMP-24.

Deux amorces de PCR conçus sur la base de la séquence de l'EST AA424347 ont été utilisés pour amplifier un fragment de 410 paires de bases de MMP-24 à partir d'ADNc de placenta humain (Source de l'ADNc humain: Clontech, Palo Alto, CA). Le

5 fragment d'ADNc de MMP-24 amplifié a été cloné dans le vecteur TA pCR2.1 (Invitrogen) et analysé par séquençage. La séquence nucléotidique de MMP-24 a servi comme point de départ pour la conception d'amorces pour le clonage du reste de la séquence codante de MMP-24 par PCR ancrée. Pour le clonage de la partie 5' de l'ADNc, l'amplification par PCR a été menée avec l'amorce MMPY4 (5'-

10 TCAGGGTTCACAGGCATGGGGTATAG-3') (SEQ ID N°6), dont la séquence a été définie à partir de la séquence de l'EST AA424347, et l'amorce spécifique pour l'ancre AP1 (Kit "Marathon", Clonetech). La même approche a été utilisée pour le clonage de la région 3' de MMP-24. La réaction de PCR a été réalisée avec les amorces MMPY1 (5'-GTCCATCTATGGAGGTCTGCCTAAG-3') (SEQ ID N°7) et AP1. Les

15 fragment d'ADNc amplifiés ont été clonés dans le vecteur pCR2.1 (Invitrogen). Les clones positifs ont été identifiés par hybridation sur colonies avec un système DIG pour hybridation sur filtre (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). La procédure a été réalisée selon les instructions du fournisseur du kit avec des amorces marquées au DIG comme sonde. La région codante de l'ADNc de MMP-24 a ensuite

20 été amplifiée par PCR en utilisant un kit "Advantage-GC ADNc PCR" (Clontech) avec les amorces MMPY11 (5'-AAGAGAGGAATGAAGCGCCTTCTGC-3') (SEQ ID N°8) et MMPY18 (5'-CGGTCTATGAATTTATTGATAAATAGAAGTG-3') (SEQ ID N°9). Le produit d'amplification de 1563 paires de bases (MMP24-FL; Full Length) a été cloné dans le vecteur TA pCR2.1 (Invitrogen). Un fragment de l'ADNc

25 de MMP-24 (MMP-24ΔT), sans la partie codant pour la région transmembranaire, a aussi été amplifié à l'aide des amorces MMPY11 (5'-AAGAGAGGAATGAAGCGCCTTCTGC-3') et MMPY22STOP (5'-CTATCGGCCTTATGGGCCTGAATGTGCTTTTCCTTAACTC-3') (SEQ ID N°10) et cloné dans le plasmide pCR2.1. Les deux inserts ont été entièrement

30 séquencés.

Les inserts MMP-24Flet MMP-24ΔT ont été reclés dans le plasmide pcDNA3.1-MYC-HIS (Invitrogen, Leek, Hollande) pour les essais de transcription-traduction et pour la transfection transitoire dans les cellules COS-I.

5 Résultats :

Le motif FKDRXXWR (SEQ ID N°11) est conservé dans les domaines hemopexines de la famille des protéinases MMP. La présence de la séquence codant pour le motif FKDRXXWR dans la banque de donnée EST a été recherchée à l'aide du logiciel TBLATNT. Le résultat de cette recherche a été criblé pour la présence de longues
10 régions codantes dans les différentes phases de lectures (ORFs). Les ORFs avec des homologies pour les MMPs ont été comparées avec les séquences de protéines déposées dans la base de données Swissprot à l'aide du logiciel BLASTP. La séquence en acides aminés de l'EST AA424347 avait une forte homologie avec la stromélysine 1 de lapin et la stromélysine 2 humaine. Différentes cellules humaines et
15 lignées cellulaires humaines (HEK 293, HUVEC, JF7, RPMI 8226, RPMI 8866, HMC1, HFB1, U266 et placenta) ont été criblées par transcription reverse et PCR (RT-PCR), en utilisant des amorces spécifiques, pour l'expression de l'ARNm codant pour la nouvelle MMP dont une partie de la séquence est contenue dans l'EST AA424347. Un fragment d'ADNc avec une séquence identique à celle de cet EST a été amplifié en
20 utilisant de l'ADNc de placenta comme source de ADNc.

Pour cloner la région codante complète de l'ARNm de la nouvelle métalloprotéinase, on a choisi une approche basée sur la PCR ancrée en utilisant comme substrat de la réaction de l'ADNc de placenta lié à un adaptateur. Grâce à cette technique, une région de 738 paires de bases de l'ADNc située en amont de la zone couverte par l'EST
25 AA424347 a été obtenue. Ce fragment comprend un codon d'initiation AUG putatif précédé par une séquence consensus Kozac. En parallèle, un segment d'ADNc localisé en aval de la région contenue dans l'EST a été amplifiée. Ce segment comprend une queue polyA+. En utilisant l'information obtenue par le séquençage des produits de PCR ancrée, la région codante complète de l'ADNc de la nouvelle MMP a été clonée
30 par transcription reverse et PCR. L'ADNc obtenu de 1554 paires de bases code pour

un précurseur de protéinase de 526 acides aminés (poids moléculaire prédit : 59 kDa) avec toutes les caractéristiques des membres de la famille des métalloprotéinase matricielles (MMPs). La méthionine codée par le codon d'initiation est suivie d'un peptide signal putatif comprenant 19 résidus hydrophobes (aa 1- aa 19) comme chez
 5 les autres membres de la famille MMP, suggérant que cette nouvelle MMP est ciblée dans le réticulum endoplasmique. Le peptide signal est suivi d'un prodomaine contenant la séquence très conservée PRCGVDP (SEQ ID N°12) (aa 20 – aa 98). Cette séquence comprend une cystéine unique (à la position 91), qui, chez les autres MMP a comme rôle d'inactiver le proenzyme en liant le zinc du domaine catalytique ("cysteine switch").
 10 Le domaine catalytique de 163 acides aminés (aa 99 – aa 262) comprend le motif liant le zinc HESGHALGLSHS (SEQ ID N°4) qui est très conservé, ainsi qu'une méthionine située sept résidus en aval de ce motif, présente chez toutes les MMPs. Il a été proposé que cette méthionine joue un rôle essentiel dans la structure du site actif de cette famille d'enzymes (21). Le domaine catalytique est
 15 suivi d'une région charnière de 22 acides aminés (aa 263 – aa 283) comprenant six prolines. Le segment carboxy terminal, d'une longueur de 230 acides aminés contient une région homologue aux domaines hémapexines présents chez toutes les MMPs à l'exception de MMP-7. Finalement, la métalloprotéinase se termine par une région hydrophobe de 24 acides aminés (Fig. 1). Cette comparaison de structure primaire
 20 suggère que la phase ouverte de lecture de l'ADNc cloné code pour un nouveau membre de la famille MMP que nous avons nommé MMP-24, MMP-23 étant le dernier membre de la famille MMP répertorié jusqu'à présent (11).

Une comparaison de séquence avec chacun des membres de la famille des MMP a été effectuée afin d'essayer de classer MMP-24 dans une de ces sous familles de MMP.
 25 Cette comparaison indique que MMP-24 se rapproche du groupe des stromélysines (22) avec une plus forte homologie pour la stromélysine 2 (52% d'identité ; Fig. 2). Une comparaison a été effectuée sur le domaine catalytique uniquement : Ce domaine de MMP-24 est identique à 60% à celui des stromélysines humaines 1 et 2 (MMP-3, MMP-10) et des collagénase humaines 1 et 2 (MMP-8, MMP-1; Fig. 2). Trois acides
 30 aminés situés proches du domaine liant le zinc (Tyr-214, Asp-235, Gly-237 suivant la

numérotation de la collagénase-3) ont été décrits comme fondamentaux pour l'activité collagénase (23) et sont absent des stromélysines. Dans la séquence de MMP-24 ces trois acides aminés sont remplacés par les Phe-208, Asp-229, et Thr-231. Cette différence indique qu'il est improbable que MMP-24 soit une collagénase. De même, en raison de l'absence d'un domaine répété de type fibronectine-II, il est improbable que MMP-24 appartienne au sous groupe des gélatinases.

Les stromélysines possèdent une région hydrophobe caractéristique comprenant neuf acides aminés en aval du domaine catalytique. Un motif similaire mais plus court (7 acides aminés) peu être identifié dans le domaine catalytique de MMP-24 (Fig. 1). Les domaines catalytiques des MMPs sont connus comme liant deux molécules de zinc. Becker et collaborateurs (24) ont montrés que pour MMP-3, une molécule de zinc est située au niveau du site actif et lie les chaînes secondaires des acides aminés His 201, His 205 et His 211, alors que l'autre molécule de zinc a une fonction structurale et interagit avec les chaînes secondaires des résidus Asp 153, His 151, His 166 et His 179. Une situation similaire peut être postulé pour MMP-24 de par la présence des acides aminés His 165, His 181, Asp 182 et His 194 suggérant que MMP-24 a aussi la capacité de lier deux molécules de zinc. Pour MMP-3, il a été suggéré que ce deuxième zinc est critique pour maintenir la protéase dans une forme active liant le second zinc, en maintenant le premier site de liaison du calcium (His 151 à His 166) à l'écart du site actif et en aidant l'organisation de la poche du site actif pour la liaison au substrat (25). La séquence protéique de MMP-24 a aussi un point commun avec une autre sous classe de MMP, les MT-MMPs : la région carboxy terminale du domaine hemopexine contient une série de 24 acides aminés essentiellement hydrophobes (Fig.1). Néanmoins, à la différence des MT-MMPs et de la stromélysine 3, MMP-24 ne possède pas de séquence consensus R-X-R/X-R entre les domaines pro et catalytique pour l'activation par clivage intracellulaire de la proenzyme par la furine (9) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32). Enfin, le domaine catalytique de MMP-24 comprend le site de N-glycosilation (N-Y-S/T) qui est conservé chez les collagénases, stromélysines-1 et -2, métalloelastase de macrophage et les MT-1, -2 and -3 MMPs, et dont la glycosilation a été démontrée pour plusieurs de ces MMPs. Six autre sites putatifs de N-glycosylation

ont pu être localisés aux positions 55-58, 110-113, 200-203, 452-455, 470-473 et 508-511. Selon ces comparaisons structurales avec la séquence d'autres MMPs, MMP-24 peut être regroupée dans la famille des stromélysines. Elle représenterait alors le quatrième membre de cette sous classe et serait donc nommée stromélysine-4.

5

Exemple 2 : Analyse de l'expression de MMP-24

Matériels et méthodes:

Source des cellules et conditions de culture.

- 10 Les lignées HEK 293, COS1, RPMI 8226, RPMI 8866, HT29, Raji, THP-I ont été obtenues de l' American Type Culture Collection (ATCC ; Manassas, VA) et cultivées selon les instructions de l'ATCC. La lignée HMC-1 nous a été généreusement donnée par le Dr. J. Butterfield (Mayo clinic, Rochester, MN). Cette lignée a été cultivée dans du milieu DMEMF12 additionné de sérum de veau foetal 10 % (FCS). La source et les
- 15 conditions de culture des lignées U266, Jijoye, HFB1 et du clone de cellules T JF7 ont été décrites précédemment (12) ; (13). Les cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) ont été isolées et cultivées comme décrit précédemment (14). Les clones de mélanome invasifs TIC3 et non invasifs IC8 nous ont été obligeamment données par le Dr. D. Schmitt (INSERM, U346, Lyon, FR.). Elles ont été cultivées en
- 20 monocouche dans du milieu McCoy 5A (GIBCO) additionné de 10% de FCS.

Analyse par Northern blot.

- Pour l'analyse de l'expression du transcrit MMP-24 dans les tissus humains, un fragment de 820 paires de bases de l'ADNc de MMP-24 a été amplifié par PCR à
- 25 l'aide des amorces MMPY9 (5'-GGGGCTCTCTCACTCCAATGATCAAAC-3') (SEQ ID N°13) et MMPY8 (5'- GATATCAAAACAAATGAGGAGTTC-3') (SEQ ID N°14). Il a ensuite été marqué par "random priming" (15) en incorporant du [α -32P]-dCTP (220 TBq/mmol; Amersham France SA, Les Ulis, France). Ce fragment radiomarké a été utilisé comme sonde pour les essais Northern blot avec les ARNs de
- 30 tissus humains (membranes "Human 12-lane Multiple Tissue Northern blot" et

“Human Immune System Blot II”; Clontech). Les hybridations, effectuées dans la solution “ExpressHyb” (Clontech), et les lavages, ont été conduits selon les instructions de Clontech. Pour l’analyse de l’expression de l’ARN codant pour MMP-24 dans les lignées cellulaires, l’ARN polyA⁺ a été isolé par la procédure au thiocyanate de guanidium-trifluoroacétate de césium et chromatographie sur sépharose oligo-dT (16). Pour produire une sonde ARNc, l’ADNc de MMP-24 cloné dans pCR 2.1 a été coupé avec l’enzyme de restriction Bam HI, et transcript par la polymérase T7 en présence de [α -32P]-UTP (Amersham, 220 TBq/mmol). Des aliquots d’ARN poly A⁺ (2 μ g) ont été séparés par électrophorèse sur gel agarose 1%, 6% formaldéhyde, électotransférés sur membrane Nylon⁺ et fixé aux UV (18). Les conditions d’hybridation et de lavage des essais Northern blot étaient identiques à celles décrites précédemment (19).

Transfection transitoire.

Les cellules COS-I ont été transfectées avec les plasmides MMP24FL-pcDNA3.1-MYC-HIS et MMP24 Δ T-pADNc3.1-MYC -HIS à l’aide du réactif FuGENE 6 (Boehringer Mannheim) en suivant les recommandations du producteur.

Analyse par Western Blot.

Les cellules COS-I et leurs milieux de culture ont été récoltés 72h après transfection. Les surnageants ont été centrifugés 5 minutes à 2 000 tours par minutes (rpm), 5 minutes à 4 000 rpm dans un rotor 8160 (Heraeus Instruments, Osterode, Germany) pour éliminer les débris cellulaires puis concentrés (Cellule de concentration AMICON; limite d’exclusion de 10kDa). Les cellules ont été lavées deux fois dans du tampon phosphate salin (PBS) et lysées dans du tampon RIPA (150 mM NaCl, 1% NP40, 0,5% DOC, 0,1% SDS, 50 mM Tris pH 8). Après 30 minutes d’incubation à 4°C, les matériaux insolubles ont été séparés des lysats cellulaires par un cycle de centrifugation de 5 minutes dans une microcentrifugeuse. Les lysats cellulaires et les surnageants ont été incubés une première fois avec de la protéine G-Sepharose seule (Amersham-Pharmacia Biotech, Sweden), puis centrifugés dans une

microcentrifugeuse afin d'éliminer la protéine G-Sepharose. Ils ont ensuite été incubés avec l'anticorps anti-C-myc (10 µg/ml) pendant une heure à 4°C. La protéine G-Sepharose a été ajoutée pour une incubation de 16h. Les protéines immunoprécipitées des cellules et des milieux de cultures ont été lavées deux fois dans les milieux d'incubation (RIPA ou RPMI, respectivement) et diluées 1 :1 dans le tampon échantillon Tris-glycine-SDS contenant 750 mM 2-β-Mercapthoethanol. Les échantillons ont été chauffés à 95°C pendant 5 minutes. Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel SDS-polyacrylamide 10% et électrotransférées sur membranes nitrocellulose (20). Les membranes ont été bloquées pendant 16h à 4°C dans 20 mM Tris, 154 mM NaCl, 0,1% Tween-20 contenant 5% de lait écrémé lyophilisé. Elles ont ensuite été incubées 2h avec le même tampon contenant de l'anticorps anti-C-myc tag couplé à la peroxydase, diluée 1/1000 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). L'anticorps lié a été détecté par chimioluminescence (ECL, Amersham France, SA).

15

Marquage des cellules par immunofluorescence.

Pour détecter l'expression de MMP-24FL et MMP-24ΔT dans les cellules COS-I, les cultures ont été fixées 72h après transfection avec du PBS contenant 4% de paraformaldehyde pendant 15 minutes à 22°C, lavées deux fois dans du PBS et incubées pendant 20 minutes avec un anticorps monoclonal spécifique, dirigé contre le tag c-myc dilué à 10 µg/ml (Roche Molecular Biochemicals) dans du PBS contenant 0.1% de saponine. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois avec du PBS additionné de 0.01% de saponine et incubées comme décrit ci-dessus avec un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de souris conjugué au FITC (Silenus Laboratories, Hawthorn, Australie) dilué 1/200 dans du PBS avec 0.1% de saponine. Les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS 0.01% de saponine. La fluorescence a été analysée avec un microscope confocal Zeiss LSM 510 (Carl ZEISS, Göttingen, Allemagne).

25

Résultats :

30 **Distribution tissulaire.**

Pour analyser l'expression de l'ARNm de MMP-24, nous avons utilisé un fragment de l'ADNc correspondant à la région codant pour la partie carboxy terminale de MMP-24 comme sonde. L'analyse par Northern blot a été effectuée avec de l'ARN poly A+ isolé de divers tissus humains. Un transcrit de 1.6 kb a été observé sur de l'ARN isolé de foie adulte et foetal, de rein, d'intestin grêle et de moelle osseuse (Fig. 3). Une expression plus faible du même transcrit est aussi détectable dans le thymus, le cœur et le placenta. Ce profil d'expression est comparable à celui décrit pour les MT1-MMP et MT2-MMP (29). Généralement, les MMPs ne sont pas synthétisées dans les cellules adultes dans des conditions normales (cellules quiescentes). La présence de l'ARNm codant pour MMP-24 dans un grand nombre de tissus normaux suggère que cette enzyme joue un rôle dans le processus de remaniement de la matrice extracellulaire au sein de ces tissus directement ou indirectement par activation d'autres MMPs. MMP-24 pourrait aussi être impliquée dans d'autres processus qui sont connus pour être médiés par des MMPs tels que l'activation de protéinases sécrétées, le relargage après clivage de cytokines membranaires, facteurs de croissance et récepteurs hormonaux (36) (37) (38). L'analyse de l'expression de l'ARN messenger de MMP-24 a été étendue aux lignées cellulaires (fig 3). Le transcrit de MMP-24 a été détecté dans la lignée cellulaire de myélome RPMI 8226, la lignée de fibroblaste de rein transformé par l'adénovirus HEK 293, la lignée de lymphome B HFB1 et les clones de mélanomes TIC3 and IC8. Les mélanomes sont connues comme des tumeurs très invasives et à haut potentiel métastatique. L'expression du transcrit codant pour MMP-24 dans des lignées de mélanome est compatible avec un rôle de ces protéases dans ces processus.

Expression de MMP-24 dans les cellules COS-1 transfectées de manière transientes.

Des transfections de cellules COS-1 ont été effectuées afin de vérifier directement la capacité de l'ADNc de MMP-24 à coder une protéine et déterminer la localisation cellulaire de cette protéine. Comme MMP-24 comprend une région hydrophobe en carboxy terminal, deux constructions ont été utilisées. La première est une forme tronquée de l'ADNc où les 100 dernières paires de bases de la région codante ont été

éliminées (MMP24- Δ T), alors que la seconde contient l'ensemble de la région codante (MMP24-FL). Une région codant pour un épitope reconnu par l'anticorps anti c-myc a été ajoutée en 3' des ORFs des deux constructions pour la détection et la purification de MMP-24. L'analyse par Western blot avec l'anticorps monoclonal anti-c-myc a

5 révélé que les deux construction d'ADNc codaient pour des protéines ayant la taille attendue (respectivement 59 et 60 kDa ; Fig. 4). La protéine MMP24-FL n'était détectable que dans le lysat cellulaire alors que la protéine MMP24- Δ T était observable aussi bien dans le lysat cellulaire que dans les surnageants des transfectants (Fig.4). Ces résultats suggèrent que l'ADNc de MMP-24 que nous avons cloné code

10 pour une protéine membranaire.

Toutes les MT-MMPs décrites jusqu'à maintenant (29) (28) ont une région cytoplasmique plus longue que celle prédite pour MMP-24 (qui a seulement deux acides aminés intracytoplasmiques potentiels). De plus MMP-24 est plus proche, de

15 par sa séquence, des stromélysines que des MT-MMPs. Ces résultats montrent que MMP-24 représente la première stromélysine membranaire. Aussi bien les MT-MMPs que les stromélysines ont été impliquées dans la régulation de l'activité d'autres MMPs. MMP-24 pourrait donc être impliquée dans ce type de fonction.

REFERENCES

- 5 1. Werb, Z. (1997) *Cell* 91, 439-442
2. Matrisian, L.M. (1990) *Trends.Genet.* 6, 121-125
3. Tsuchiya, Y., ENDO, Y., Sato, H., Okada, Y., Mai, M., Sasaki, T., and Seiki, M.
(1994) *Int.J.Cancer* 56, 46-51
4. Belaaouaj, A., Shipley, J.M., Kobayashi, D.K., Zimonjic, D.B., Popescu, N.,
10 Silverman, G.A., and Shapiro, S.D. (1995) *J.Biol.Chem.* 270, 14568-14575
5. Marti, H.P., McNeil, L., Thomas, G., Davies, M., and Lovett, D.H. (1992)
Biochem.J. 285, 899-905
6. Pendas, A.M., Knauper, V., Puente, X.S., Llano, E., Mattei, M.G., Apte, S.,
Murphy, G., and Lopez-Otin, C. (1997) *J.Biol.Chem.* 272, 4281-4286
- 15 7. Llano, E., Pendas, A.M., Knauper, V., Sorsa, T., Salo, T., Salido, E., Murphy,
G., Simmer, J.P., Bartlett, J.D., and Lopez-Otin, C. (1997) *Biochemistry* 36, 15101-
15108
8. Murphy, G. and Knauper, V. (1997) *Matrix Biol.* 15, 511-518
9. Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E., and
20 Seiki, M. (1994) *Nature* 370, 61-65
10. Takino, T., Sato, H., Yamamoto, E., and Seiki, M. (1995) *Gene* 155, 293-298
11. Velasco, G., Pendas, A.M., Fueyo, A., Knauper, V., Murphy, G., and Lopez-
Otin, C. (1999) *J.Biol.Chem.* 274, 4570-4576
12. Pochon, S., Graber, P., Yeager, M., Jansen, K., Bernard, A.R., Aubry, J.P., and
25 Bonnefoy, J.Y. (1992) *J.Exp.Med.* 176, 389-397
13. Gauchat, J.F., Aubry, J.P., Mazzei, G., Life, P., Jomotte, T., Elson, G., and
Bonnefoy, J.Y. (1993) *FEBS Lett.* 315, 259-266
14. Schnyder, B., Lugli, S., Feng, N., Etter, H., Lutz, R.A., Ryffel, B., Sugamura, K.,
Wunderli-Allenspach, H., and Moser, R. (1996) *Blood* 87, 4286-4295
- 30 15. Feinberg, A.P. (1983) *Anal.Biochem.* 132, 6-13

16. Okayama, H., Kawaichi, M., Brownstein, M., Lee, F., Yokota, T., and Arai, K. (1987) *Methods Enzymol.* 154, 3-28
17. Krieg, P.A. and Melton, D.A. (1987) *Methods Enzymol.* 155, 397-415
18. Khandjian, E.W. (1986) *Mol.Biol.Rep.* 11, 107-115
- 5 19. Gauchat, J.F., Gauchat, D., De Weck, A.L., and Stadler, B.M. (1989) *Eur.J.Immunol.* 19, 1079-1085
20. Burnette, W.N. (1981) *Analytical Biochemistry* 112, 195-203
21. Stocker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemer, P., Gomis-Ruth, F.X., McKay, D.B., and Bode, W. (1995) *Protein Sci.* 4, 823-840
- 10 22. Murphy, G. and Docherty, A.J. (1992) *Am.J. Respir.Cell Mol.Biol.* 7, 120-125
23. Sanchez-Lopez, R., Alexander, C.M., Behrendtsen, O., Breathnach, R., and Werb, Z. (1993) *J.Biol.Chem.* 268, 7238-7247
24. Becker, J.W., Marcy, A.I., Rokosz, L.L., Axel, M.G., Burbaum, J.J., Fitzgerald, P.M., Cameron, P.M., Esser, C.K., Hagmann, W.K., and Hermes, J.D. (1995) *Protein*
- 15 *Sci.* 4, 1966-1976
25. Wetmore, D.R. and Hardman, K.D. (1996) *Biochemistry* 35, 6549-6558
26. Okada, A., Bellocq, J.P., Rouyer, N., Chenard, M.P., Rio, M.C., Chambon, P., and Basset, P. (1995) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92, 2730-2734
27. Strongin, A.Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B.L., Grant, G.A., and
- 20 Goldberg, G.I. (1995) *J.Biol.Chem.* 270, 5331-5338
28. Will, H. and Hinzmann, B. (1995) *Eur.J.Biochem.* 231, 602-608
29. Takino, T., Sato, H., Shinagawa, A., and Seiki, M. (1995) *J.Biol.Chem.* 270, 23013-23020
30. Puente, X.S., Pendas, A.M., Llano, E., Velasco, G., and Lopez-Otin, C. (1996)
- 25 *Cancer Res.* 56, 944-949
31. Pei, D. and Weiss, S.J. (1995) *Nature* 375, 244-247
32. Santavicca, M., Noel, A., Angliker, H., Stoll, I., Segain, J.P., Anglard, P., Chretien, M., Seidah, N., and Basset, P. (1996) *Biochem.J.* 315, 953-958
33. Pendas, A.M., Matilla, T., Estivill, X., and Lopez-Otin, C. (1995) *Genomics* 26,
- 30 615-618

34. Pendas, A.M., Santamaria, I., Alvarez, M.V., Pritchard, M., and Lopez-Otin, C. (1996) *Genomics* 37, 266-268
35. Schuler, G.D., Boguski, M.S., Stewart, E.A., Stein, L.D., Gyapay, G., Rice, K., White, R.E., Rodriguez-Tome, P., Aggarwal, A., Bajorek, E., Bentolila, S., Birren, B.B., Butler, A., Castle, A.B., Chiannikulchai, N., Chu, A., Clee, C., Cowles, S., Day, P.J., Dibling, T., Drouot, N., Dunham, I., Duprat, S., East, C., and Hudson, T.J. (1996) *Science* 274, 540-546
36. Massague, J. and Pandiella, A. (1993) *Annu.Rev.Biochem.* 62, 515-541
37. McGeehan, G.M., Becherer, J.D., Bast, R.C.J., Boyer, C.M., Champion, B., Connolly, K.M., Conway, J.G., Furdon, P., Karp, S., and Kidao, S. (1994) *Nature* 370, 558-561
38. Couet, J., Sar, S., Jolivet, A., Hai, M.T., Milgrom, E., and Misrahi, M. (1996) *J.Biol.Chem.* 271, 4545-4552

LISTE DE SEQUENCES

<110> Pierre Fabre Médicament

<120> Métalloprotéase MMP-24

<130> D18282

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.2

<210> 1

<211> 1583

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Gène codant pour MMP-24

<400> 1

```

gaagaaagag aggaatgaag cgccttctgc ttctgttttt gttctttata acattttctt 60
ctgcatttcc cttagtccgg atgatggaaa atgaagaaaa tatgcaactg gctcaggcat 120
atctcaacca gttctactct cttgaaatag aagggaatca tcttggtcaa agcaagaata 180
ggagtctcat agatgacaaa attcgggaaa tgcaagcatt ttttggttg acagtgactg 240
gaaaactgga ctcaaacacc cttgagatca tgaagacacc caggtgtggg gtgcctgatg 300
tgggccagta tggctacacc ctccctgggt ggagaaaata caacctcacc tacagaataa 360
taaaactatac tccggatatg gcacgagctg ctgtgatgag gctatccaag aaggtttaga 420
agtgtggagc aaagtcactc cactaaaatt caccaagatt tcaaagggga ttgcagacat 480
catgattgcc tttaggactc gagtccatgg tcggtgtcct cgctattttg atggtccctt 540
gggagttctt ggccatgcct ttctccctg gtcgggtctg ggtggtgaca ctcatthttga 600
tgaggatgaa aactggacca aggatggagc aggattcaac ttgtttcttg tggctgctca 660
tgaatttggg catgcactgg ggctctctca ctccaatgat caaacagcct tgatgttccc 720
aaattatgtc tccctggatc ccagaaaata ccactttct caggatgata tcaatggaat 780
caagtccatc tatggagtc tgcctaaggt acctgctaag ccaaaggaac ccactatacc 840
ccatgcctgt gaccctgact tgacttttga cgctatcaca actttccgca gagaagtaat 900
gttctttaaa ggcaggcacc tatggaggat ctattatgat atcacggatg ttgagtttga 960
attaattgct tcattctggc catctctgcc agctgatctg caagctgcat acgagaaccc 1020
cagagataag attctggttt ttaaagatga aaacttctgg atgatcagag gatatgctgt 1080
cttgccagat tatcccaaat ccatccatac attaggtttt ccaggacgtg tgaagaaaat 1140
agatgcagcc gtctgtgata agaccacaag aaaaacctac ttctttgttg gcatttggtg 1200
ctggaggttt gatgaaatga cccaaccat ggacaaaggg ttcccgcaga gagtggtaaa 1260
acactttcct ggaatcagta tccgtgttga tgctgtttc cagtacaaag gattcttctt 1320
tttcagccgt ggatcaaagc aatttgaata cgacattaag acaaagaata ttacccgaat 1380
catgagaact aatacttggg ttcaatgcaa agaaccaaag aactcctcat ttggttttga 1440
tatcaacaag gaaaaagcac attcaggagg cataaagata ttgtatcata agagttaaag 1500
cttgtttatt tttggtattg ttcatttgct gaaaaacact tctatttatc aataaattca 1560
tagaccataa ataaaaaaaa aaa 1583

```

<210> 2

<211> 513

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Séquence de MMP-24

<400> 2

Met Lys Arg Leu Leu Leu Leu Phe Leu Phe Phe Ile Thr Phe Ser Ser
 1 5 10 15
 Ala Phe Pro Leu Val Arg Met Thr Glu Asn Glu Glu Asn Met Gln Leu
 20 25 30
 Ala Gln Ala Tyr Leu Asn Gln Phe Tyr Ser Leu Glu Ile Glu Gly Asn
 35 40 45
 His Leu Val Gln Ser Lys Asn Arg Ser Leu Ile Asp Asp Lys Ile Arg
 50 55 60
 Glu Met Gln Ala Phe Phe Gly Leu Thr Val Thr Gly Lys Leu Asp Ser
 65 70 75 80
 Ser Thr Leu Glu Ile Met Lys Thr Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp Val
 85 90 95
 Gly Gln Tyr Gly Tyr Thr Leu Pro Gly Trp Arg Lys Tyr Asn Leu Thr
 100 105 110
 Tyr Arg Ile Ile Asn Tyr Thr Pro Asp Met Ala Arg Ala Ala Val Asp
 115 120 125
 Glu Ala Ile Gln Glu Gly Leu Glu Val Trp Ser Lys Val Thr Pro Leu
 130 135 140
 Lys Phe Thr Lys Ile Ser Lys Gly Ile Ala Asp Ile Met Ile Ala Phe
 145 150 155 160
 Arg Thr Arg Val His Gly Arg Cys Pro Arg Tyr Phe Asp Gly Pro Leu
 165 170 175
 Gly Val Leu Gly His Ala Phe Pro Pro Gly Pro Gly Leu Gly Gly Asp
 180 185 190
 Thr His Phe Asp Glu Asp Glu Asn Trp Thr Lys Asp Gly Ala Gly Phe
 195 200 205
 Asn Leu Phe Leu Val Ala Ala His Glu Ser Gly His Ala Leu Gly Leu
 210 215 220
 Ser His Ser Asn Asp Gln Thr Ala Leu Met Phe Pro Asn Tyr Ala Ser
 225 230 235 240
 Leu Asp Pro Arg Lys Tyr Pro Leu Ser Gln Asp Asp Ile Asn Gly Ile
 245 250 255
 Gln Ser Ile Tyr Gly Gly Leu Pro Lys Val Pro Ala Lys Pro Lys Glu
 260 265 270

Pro Thr Ile Pro His Ala Cys Asp Pro Asp Leu Lys Thr Phe Asp Ala
 275 280 285
 Ile Thr Thr Phe Arg Arg Glu Val Met Phe Phe Lys Gly Arg His Leu
 290 295 300
 Trp Arg Ile Tyr Tyr Asp Ile Thr Asp Val Glu Phe Glu Leu Ile Ala
 305 310 315 320
 Ser Phe Trp Pro Ser Leu Pro Ala Asp Leu Gln Ala Ala Tyr Glu Asn
 325 330 335
 Pro Arg Asp Lys Ile Leu Val Phe Lys Asp Glu Asn Phe Trp Met Ile
 340 345 350
 Arg Gly Tyr Ala Val Leu Pro Asp Tyr Pro Lys Ser Ile His Thr Leu
 355 360 365
 Xaa Phe Pro Gly Arg Val Lys Lys Ile Asp Ala Ala Val Cys Asp Lys
 370 375 380
 Thr Thr Arg Lys Thr Tyr Phe Phe Val Gly Ile Trp Cys Trp Arg Phe
 385 390 395 400
 Asp Glu Met Thr Gln Thr Met Asp Lys Gly Phe Pro Gln Arg Val Val
 405 410 415
 Lys His Phe Pro Gly Ile Ser Ile Arg Val Asp Ala Ala Phe Gln Tyr
 420 425 430
 Lys Gly Phe Phe Phe Phe Ser Arg Gly Ser Lys Gln Phe Glu Tyr Asn
 435 440 445
 Ile Lys Thr Lys Asn Ile Thr Arg Ile Met Arg Thr Asn Thr Trp Phe
 450 455 460
 Gln Cys Lys Glu Pro Lys Asn Ser Ser Phe Gly Phe Asp Ile Asn Glu
 465 470 475 480
 Lys Ala His Ser Gly Gly Ile Lys Ile Leu Tyr His Lys Ser Leu Ser
 485 490 495
 Leu Phe Ile Phe Gly Ile Val His Leu Leu Lys Asn Thr Ser Ile Tyr
 500 505 510

Gln

<210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

29

<220>
 <223> Domaine catalytique avec la séquence hautement conservée liant le zinc

<220>
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa représente Ser ou Thr.

<400> 3
 His Glu Xaa Gly His Xaa Xaa Gly Xaa Xaa His Xaa
 1 5 10

<210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Domaine catalytique avec une séquence liant le zinc

<400> 4
 His Glu Ser Gly His Ala Leu Gly Leu Ser His Ser
 1 5 10

<210> 5
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Motif protéique

<400> 5
 Glu Asp Gly Ile Ala Gln Ile Arg Gly Glu Ile Phe Phe Phe Lys Asp
 1 5 10 15

Arg Phe Ile Trp Arg
 20

<210> 6
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Amorce MMPY4

<400> 6
 tcagggtcac aggcattggg tatag

25

<210> 7
<211> 25
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Amorce MMPY1

<400> 7
gtccatctat ggaggtctgc ctaag

25

<210> 8
<211> 25
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Amorces MMPY11

<400> 8
aagagaggaa tgaagcgcct tctgc

25

<210> 9
<211> 31
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> MMPY18

<400> 9
cgtctatga atttattgat aaatagaagt g

31

<210> 10
<211> 42
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Amorce MMPY22STOP

<400> 10
ctatcggcct tatgggcctg aatgtgcttt ttccttaaac tc

42

<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Motif conservé dans les domaines hemopexines

31

<400> 11
Phe Lys Asp Arg Xaa Xaa Trp Arg
1 5

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Séquence conservée du prodomaine (aa 20 - aa 98)

<400> 12
Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp
1 5

<210> 13
<211> 27
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Amorce MMPY9

<400> 13
ggggctctct cactccaatg atcaaac

27

<210> 14
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Amorce MMPY8

<400> 14
gatatcaaaa caaatgagga gttc

24

REVENDICATIONS

1. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence ayant au moins 80% d'identité avec le gène codant pour la metalloprotéinase MMP-24.
5
2. Séquence nucléotidique selon la revendication 1 caractérisée en ce qu'elle comporte la séquence SEQ ID N°1.
3. Séquence nucléotidique comprenant au moins 12 nucléotides consécutifs d'une
10 séquence selon l'une des revendications 1 et 2 ou d'une séquence capable de s'hybrider avec une séquence dérivée de MMP-24, notamment avec l'ARNm de MMP-24.
4. Séquence nucléotidique selon la revendication 3 caractérisée en ce qu'il s'agit
15 d'une sonde, d'une amorce, d'un oligonucléotide antisens ou d'un fragment fonctionnel de MMP-24.
5. Polypeptide caractérisé en ce qu'il comprend une séquence peptidique ayant au moins 52% d'identité avec la metalloprotéinase MMP-24.
20
6. Polypeptide selon la revendication 5 ayant la séquence SEQ ID N° 2.
7. Polypeptide comprenant une combinaison de fragments de MMP-24 correspondant à des unités fonctionnelles sélectionnés notamment parmi le peptide signal (SEQ
25 ID N°2 aa 1-19), le prodomaine (SEQ ID N°2 aa 20-98), le domaine catalytique (SEQ ID N°2 aa 99-262), le domaine charnière (SEQ ID N°2 aa 263-283) et le domaine du type hemopexine (SEQ ID N°2 aa 284-513).
8. Polypeptide selon la revendication 7 caractérisé en ce qu'il possède une activité
30 anti-angiogénique.

9. Polypeptide selon la revendication 7 comportant le domaine du type hemopexine (SEQ ID N°2 aa 284-513) caractérisé en ce que ledit domaine est capable d'interagir avec d'autres protéines ou polypeptides possédant une activité anti-inflammatoire ou anti-angiogénique.
10. Vecteur comprenant une séquence selon l'une des revendications 1 à 4 ou une séquence codant pour un polypeptide selon l'une des revendications 5 à 9.
11. Vecteur selon la revendication 10 caractérisé en ce que ladite séquence est fusionnée à un promoteur efficace dans les cellules eucaryotes et/ou procaryotes.
12. Vecteur selon la revendication 11 caractérisé en ce qu'il comporte en outre un gène de sélection.
13. Vecteur selon la revendication 11 caractérisé en ce qu'il exprime un oligonucléotide capable d'inhiber l'expression de MMP-24.
14. Anticorps capables de se lier spécifiquement à un polypeptide selon l'une des revendications 5 à 9.
15. Procédé de détection et/ou de quantification d'un polypeptide selon l'une des revendications 5 à 9 caractérisé en ce qu'il met en œuvre un oligonucléotide selon la revendication 4 ou un anticorps selon la revendication 14.
16. Kit de diagnostic caractérisé en ce qu'il comprend un oligonucléotide selon la revendication 4 ou un anticorps selon la revendication 14.
17. Procédé d'identification du substrat de MMP-24 caractérisé en ce que l'on met en œuvre la technique dite « phage display assay ».

18. Procédé de criblage de composés susceptibles d'inhiber ou d'activer la dégradation de la matrice extracellulaire par MMP-24 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) fixation d'un complexe [colorant-substrat de MMP-24] sur un support solide,
 - b) addition d'au moins un composé susceptible d'inhiber ou d'activer MMP-24,
 - c) incubation avec un polypeptide selon l'une des revendications 5 à 9,
 - d) détection de la quantité du colorant libéré.
19. Procédé selon la revendication 18 caractérisé en ce que le support solide est une plaque ELISA.
20. Composé susceptible d'être obtenu à partir du procédé selon l'une des revendications 18 et 19.
21. Composé selon la revendication 20 caractérisé en ce qu'il inhibe l'activité de MMP-24.
22. Composé selon la revendication 20 caractérisé en ce qu'il active MMP-24.
23. Composition comprenant un composé selon l'une des revendications 20 à 22 ou un vecteur selon l'une des revendications 10 à 13 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
24. Utilisation d'un composé selon l'une des revendications 20 à 22 ou d'un vecteur selon l'une des revendications 10 à 13 pour la fabrication d'un médicament.

25. Utilisation selon la revendication 24 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement du cancer, notamment pour prévenir et/ou empêcher la formation de métastases.
- 5 26. Utilisation selon la revendication 24 pour la fabrication d'un médicament pour inhiber l'angiogénèse, notamment pour prévenir et/ou détruire la vascularisation des tumeurs.
- 10 27. Utilisation selon la revendication 24 pour la fabrication d'un médicament pour le traitement des maladies inflammatoires, notamment pour le traitement de l'arthrite et des rhumatismes.

1/7

1 MKRLLLLLF FITFSAFPL VRMTENEENM QLAQAYLNQF YSLEIEGNHL
51 VQSKNRSLID DKIREMQAFF GLTVTGKIDS STLEIMKTPR CGVPDVGGQYG
101 YTLPGWRKYN LTYRIINYP DMARAAVDEA IQEGLEVWSK VTPLKFTKIS
151 KGIADIMIAF RTRVHGRCPR YFDGPLGVLG HAFPPGPGLG GDTHFDEDEN
201 WTKDGAGFNL FLVAAHESGH ALGLSHSNDQ TALMFPNYAS LDPRKYPLSQ
251 DDINGIQSIY GGLPKVPAKP KEPTIPHAQD PDLKTFDAIT TERREVMFFK
301 GRHLWRIYYD ITDVEFELIA SFWPSLPADL QAAAYENPRDK ILVFKDENFW
351 MIRGYAVLPD YPKSIHTLXF PGRVKKIDAA VCDKTTRKTY FFVGIWCWRF
401 DMTQTMDKG FPQRVVKHFP GISIRVDAAF QYKGFFFFSR GSKQFEYNIK
451 TKNITRIMRT NTWFQCKEPK NSSFGFDINE KAHSGGIKIL YHKSLSLFIF
501 GIVHLLKNTS IYQ

FIGURE 1A

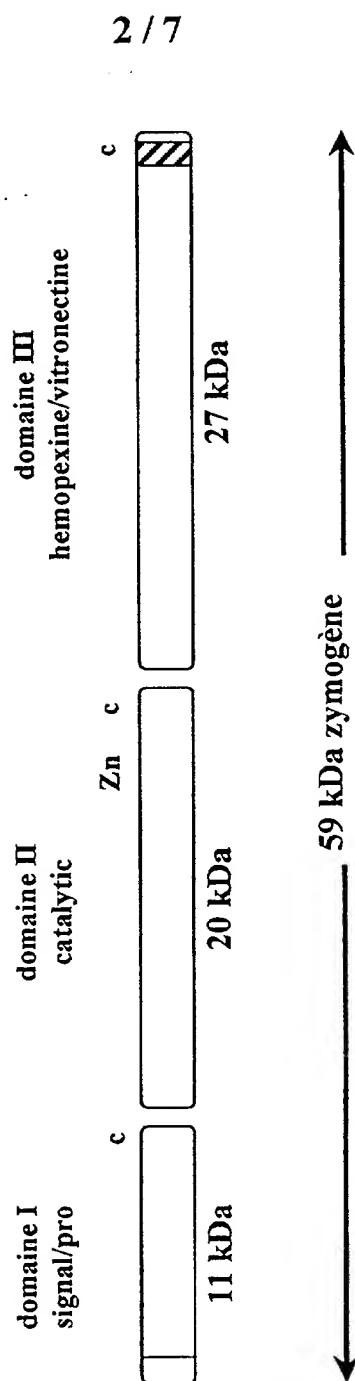


FIGURE 1B

MMP3	L L L	5P	Q YL 5Y L	6 K6 MQ F GL VTGK 1 TL QM4 PRGVPD	196
MMP10	---	---	---	---	97
MMP1	---	---	---	---	96
MMP8	---	---	---	---	97
MMP24	---	---	---	---	96
					96
MMP3	5	P W	LTYRI NVTIP 6 V A6 3PL F346 G ADI I F H FDGP L HA5 PG G6 GD H		196
MMP10	---	---	---	---	195
MMP1	---	---	---	---	196
MMP8	---	---	---	---	195
MMP24	---	---	---	---	194
MMP3	ED E WT	NL	VAAHE GH LGL HS 1 AIM5P Y	L QDD61GIQ 6YG	296
MMP10	---	---	---	---	295
MMP1	---	---	---	---	284
MMP8	---	---	---	---	285
MMP24	---	---	---	---	285
MMP3	DA63T R E 6 EK R	R	E	FWP LP 6 AAYE 4D 6 EK 5W 6 G 6 YP4 I FP 6 IDAAG	395
MMP10	---	---	---	---	394
MMP1	---	---	---	---	384
MMP8	---	---	---	---	384
MMP24	---	---	---	---	383

FIGURE 2./...

MMF3 - - - - -
MMF10 - - - - -
MMF1 - - - - -
MMF8 - - - - -
MMF24 - - - - -
SGGIKLYHKSLFI FGI VHL LKNTSIYQ
513

FIGURE 2.

5 / 7

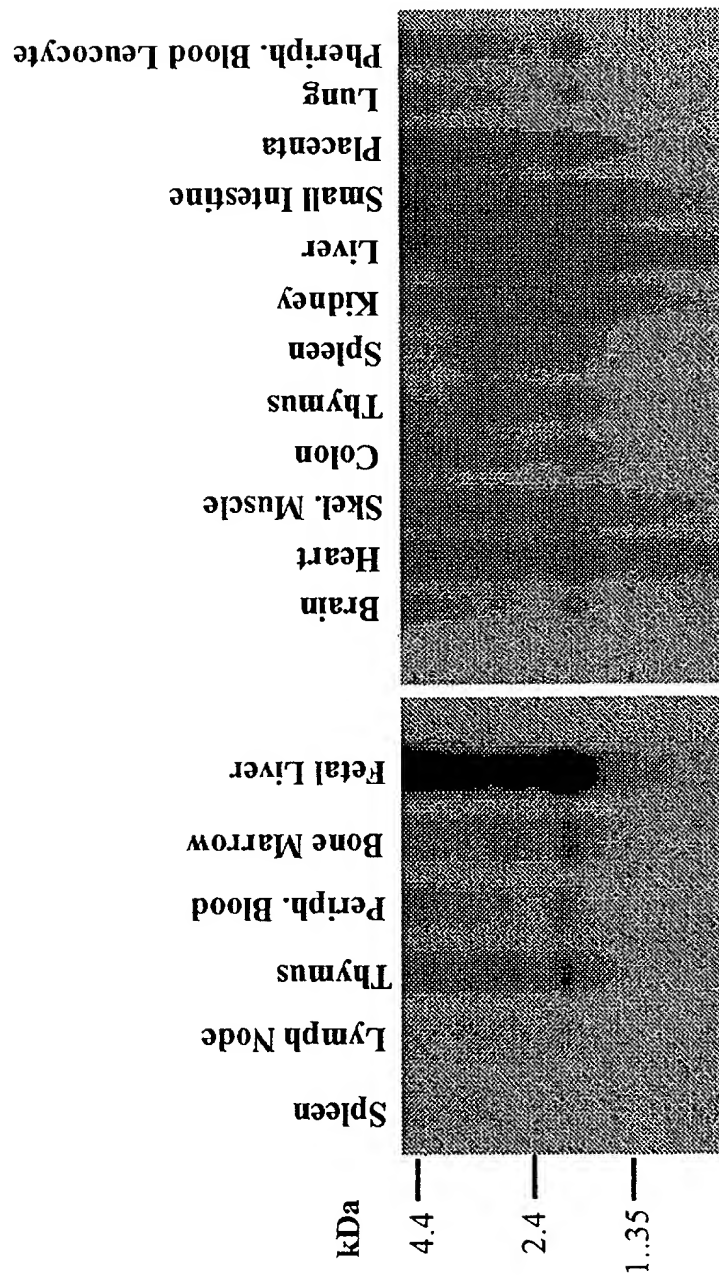


FIGURE 3A

6 / 7

HEP2
KYM-1
MCF7
THP-1
PBL
293
IC8
TIC3
Jijoye
JF7
8226
8866
HMC1
HFB1
U266
293
Caco2
Raji

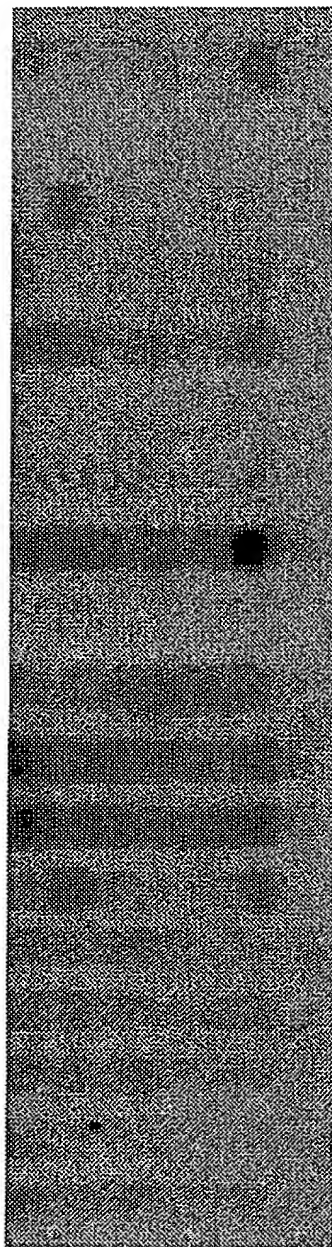


FIGURE 3B

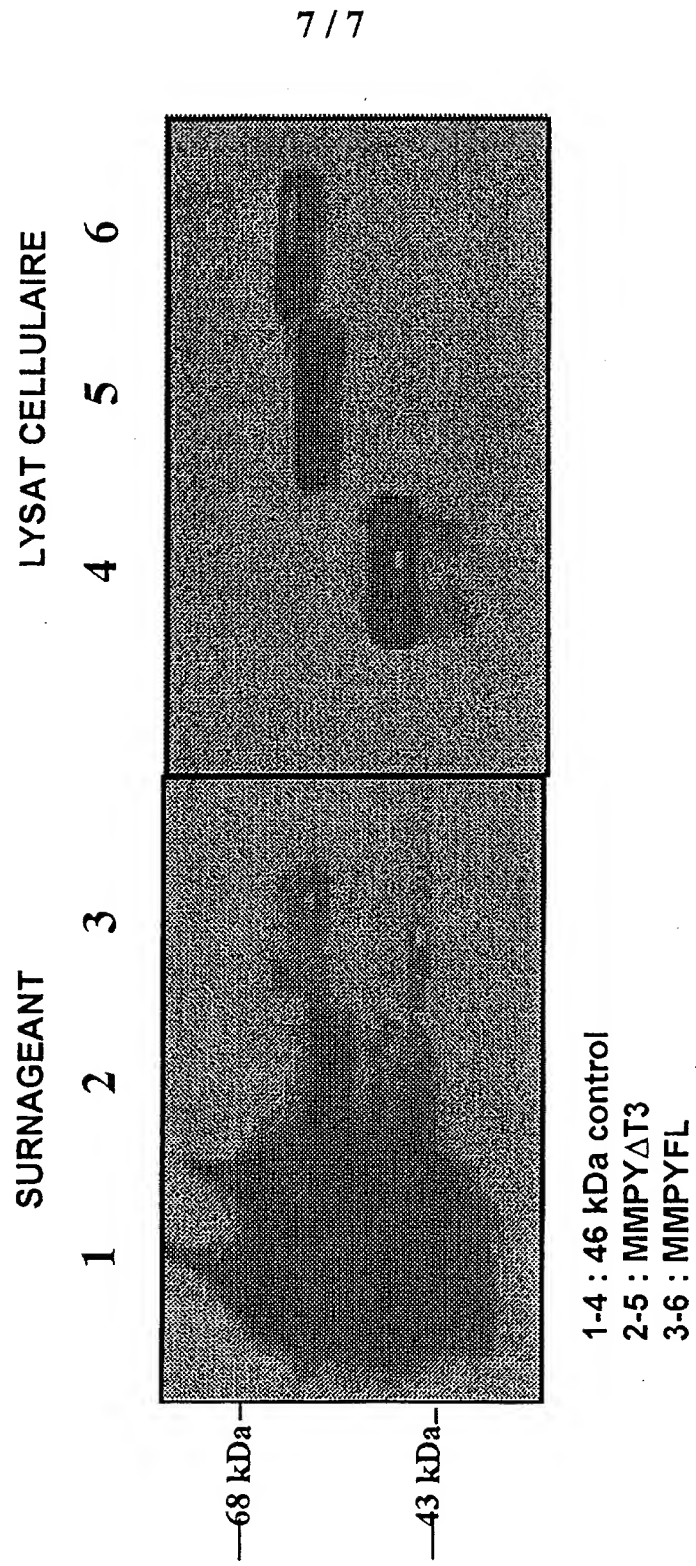


FIGURE 4

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE**
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 581269
FR 9910937

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,X	EMBL/GENBANK DATABASE Accession no AA424347 Sequence ID HS1223624 22 March 1997 HILLIER L ET AL: "WashU-Merck EST project 1997 XP002138015	1-7, 10-16
Y	* le document en entier *	8,9, 17-19, 23-27
X	EMBL/GENBANK DATABASE Accession no AA424513 Sequence ID HS1223764 22 May 1997 HILLIER L ET AL: "WashU-Merck EST project 1997 XP002138016	1-7, 10-16
Y	* le document en entier *	8,9, 17-19, 23-27
A	PENDAS A M ET AL: "IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL HUMAN MATRIX METALLOPROTEINASE WITH UNIQUE STRUCTURAL CHARACTERISTICS, CHROMOSOMAL LOCATION, AND TISSUE DISTRIBUTION" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,US,AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, vol. 272, no. 7, 14 février 1997 (1997-02-14), pages 4281-4286, XP002040910 ISSN: 0021-9258	1-7, 10-16
Y	* page 4282, colonne de droite, alinéa 6 * * page 4282, colonne de droite, alinéa 5 *	18,19
<p>---</p> <p>-/--</p>		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
19 mai 2000		Van der Schaal, C
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

3

EPO FORM 1503 03.92 (P04C13)

INSTITUT NATIONAL

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREde la
PROPRIETE INDUSTRIELLEétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFA 581269
FR 9910937

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	COSSINS J ET AL: "IDENTIFICATION OF MMP-18, A PUTATIVE NOVEL HUMAN MATRIX METALLOPROTEINASE" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS,US,ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, vol. 228, no. 2, 1 janvier 1996 (1996-01-01), pages 494-498, XP002036483 ISSN: 0006-291X * page 494, dernier alinéa *	1-7, 10-16
D,Y	BROOKS PETER C ET AL: "Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity." CELL FEB. 6, 1998, vol. 92, no. 3, 6 février 1998 (1998-02-06), pages 391-400, XP002138013 ISSN: 0092-8674 * le document en entier *	8,9,26
D,Y	SMITH MATTHEW M ET AL: "Rapid identification of highly active and selective substrates for stromelysin and matrilysin using bacteriophage peptide display libraries." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 1995, vol. 270, no. 12, 1995, pages 6440-6449; XP002138014 ISSN: 0021-9258 * le document en entier *	17
D,X	WO 97 37974 A (CHIROSCIENCE LTD ;BAXTER ANDREW DOUGLAS (GB); OWEN DAVID ALAN (GB)) 16 octobre 1997 (1997-10-16) * le document en entier *	20,21, 23-27
-/--		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
19 mai 2000		Van der Schaal, C
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

3

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)

INSTITUT NATIONAL

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREde la
PROPRIETE INDUSTRIELLEétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFA 581269
FR 9910937

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,Y	WO 98 40475 A (ABBOTT LAB) 17 septembre 1998 (1998-09-17) * page 2 - page 3 *	23-25,27
X	EMBL DATABASE Accession no 093342 Sequence 5 ID 093342 1 November 1998 YANG M AND KURKINEN M: "Cloning of a novel matrix metalloproteinase (CMMP) from embryo fibroblast" XP002138017 * le document en entier *	5
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.7)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
19 mai 2000		Van der Schaal, C
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

3

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)